

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	10 FEB 2005
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

10 2004 005 888.1

Anmeldetag:

5. Februar 2004

Anmelder/Inhaber:

Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt/DE

Bezeichnung:

Vorrichtung und Verfahren zur Kopplung von kapilla-
ren Trennverfahren und Massenspektrometrie

IPC:

G 01 N 30/72

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stark

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**Vorrichtung und Verfahren zur Kopplung von
kapillaren Trennverfahren und
Massenspektrometrie**

Vorrichtung und Verfahren zur Kopplung von kapillaren Trennverfahren und Massenspektrometrie

Die vorliegende Erfindung betrifft Kapillaren, die zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt sind sowie deren Einsatz bei der Kopplung von Verfahren wie cHPLC (kapillare HPLC), CE (Kapillarelektrophorese), CEC (Kapillarelektrochromatographie) oder pCEC (pressurized CEC) mit MS (Massenspektrometrie). Durch die erfindungsgemäße Ummantelung mit Metallfolie ist eine direkte Kopplung der Kapillaren an ein Massenspektrometer ohne Verwendung weiterer Übergangsstücke, wie Spraynadeln oder Leerkapillarstücke, möglich.

Die Flüssigchromatographie, insbesondere die HPLC, ist ein sehr weit verbreitetes Verfahren zur Trennung von Analytgemischen. Weitere Trennverfahren, vor allem für kleinere Probenvolumina, sind elektrophoretische Verfahren wie Kapillarelektrophorese (CE) oder auch Kapillarisotachophorese sowie die Kombination von elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren wie in der Kapillarelektrochromatographie (CEC) und pCEC. Diese Verfahren können in Trennsäulen bzw. Trennkapillaren oder auch in miniaturisierten planaren Systemen wie Mikrochips durchgeführt werden. Die anschließende Analyse erfolgt bislang häufig spektroskopisch. Um diese Einschränkung sowohl bezüglich der erforderlichen Menge des Analyten wie auch bezüglich der Anforderungen an die Eigenschaften der Analyten zu beheben, wird nun vermehrt eine Kombination und Kopplung der genannten Trennmethoden mit massenspektrometrischen Analysenmethoden, insbesondere ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry), versucht. Diese Kombination eröffnet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Proben schnell, mit großer Empfindlichkeit und Genauigkeit zu analysieren und ist somit gerade für biologische Anwendungen z.B. im Bereich der Genom- und Proteomanalyse von großem Interesse.

Das zentrale Problem der Kombination von chromatographischen und/oder elektrophoretischen Trennverfahren mit massenspektrometrischen Analysenmethoden in das Einbringen der relevanten Teile der Probe in das Massenspektrometer. Im Idealfall sollte dazu kein zusätzlicher manuell auszuführender Arbeitsschritt notwendig sein. Daher wurden entsprechende Übergangsstücke, sogenannte Interfaces, entwickelt, die den direkten Eintrag der Probe in das Massenspektrometer ermöglichen.

Ein Überblick über verschiedene Interface-Konstruktionen findet sich z.B. in C.J. Herring und J. Qin, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 13, 1-7 (1999).

Zumeist besteht ein Interface aus einer Spraynadel oder einer Leerkapillare, die an die Trennsäule bzw. Trennkapillare angesetzt wird. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen verschiedene Möglichkeiten nach dem Stand der Technik. Abbildung 1 zeigt Varianten, in denen der elektrische Kontakt zur Erzeugung des Elektrosprays über eine zusätzliche Kapillarsäule (5) oder die Quarzkapillare (fused silica FS, 6) umfließende Trägerflüssigkeit (Sheath liquid, 3) gewährleistet wird. In Abbildung 1a) wird direkt aus dem kapillarchromatographischen Bett gesprüht. In Abbildung 1b) wird direkt aus einer offenen Quarzglas-kapillare (open tubular fused silica (OT-FS, 6)) gesprüht, welche als Transferleitung von der Trennsäule zum Massenspektrometer dient. Mit Hilfe eines die beiden innenliegenden Kapillaren umströmenden Vernebelungsgases (4) kann auch bei höheren Flussraten ein sehr stabiler Spray erzeugt werden. Nachteil ist jedoch die Verdünnung der Probe mit der Trägerflüssigkeit und die damit verbundene stark verringerte Nachweisempfindlichkeit.

Abbildung 2 zeigt Möglichkeiten ohne Einsatz von Trägerflüssigkeit, die im folgenden einzeln näher erläutert werden:

a) Der elektrische Kontakt erfolgt über eine OT-FS-Kapillare, welche über ein T-Stück (8) zwischen Trennkapillare (5) und OT-FS-ESI-Nadel (11) angekoppelt ist und dort den "Make up"-Fluss (10) zuspießt.

b) Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Elektrode, welche über ein T-Stück (8) zwischen Trennkapillare (5) und OT-FS-ESI-Nadel (11) angekoppelt ist. Als Elektrode kann auch das Verbindungsstück (9) selbst dienen.

5 c) Der elektrische Kontakt erfolgt direkt über eine offene Edelstahlkapillare (OT-SS, 7), welche über ein Verbindungsstück (9) an die Trennkapillare (5) angekoppelt ist. Das Spray-Ende kann auch außen angespitzt sein.

d) Der elektrische Kontakt erfolgt über eine OT-FS-ESI-Nadel mit einer elektrisch leitenden Beschichtung am hinteren Ende (13), welche dort über
10 ein Verbindungsstück (9) an die Trennkapillare (5) angekoppelt ist.

e) Der elektrische Kontakt findet am Säuleneinlass statt, also weit oberhalb („flussaufwärts“) des Spray-Endes der in die integrierte ESI-Spitze (14) gepackten FS Kapillarsäule (16).

f) Der elektrische Kontakt erfolgt über eine elektrisch leitende Beschichtung am Spray-Ende der in die integrierte ESI-Spitze (15) gepackten FS Kapillarsäule (16).
15

g) Der elektrische Kontakt erfolgt über eine elektrisch leitende Beschichtung am Spray-Ende einer OT-FS-ESI-Nadel (18), welche über ein Verbindungsstück (9) an die Trennkapillare (5) angekoppelt ist.

20 Nachteilig an den Varianten 2a bis d und g ist, dass durch die sich anschließende Leerkapillare ein zusätzliches Totvolumen (7) erzeugt wird, das die Qualität der vorher durchgeführten Trennung verschlechtert.

In Abbildung 2e wird der elektrische Kontakt schon am Einlass der Trennkapillare hergestellt, wodurch die tatsächliche Spannung, die
25 letztendlich an der Elektrospray-Spitze anliegt, noch stärker als bei den Varianten 2a bis d auf sich verändernde Leitfähigkeiten der mobilen Phase (z.B. bei Gradientenelution) reagiert.

Zudem kann es durch Elektroden-Redoxprozesse in den Kapillaren zur Gasentwicklung und damit zur Blasenbildung kommen, was wiederum zu
30 Elektrosprayinstabilitäten führen kann. Davon ist wiederum Variante 2e besonders stark betroffen.

Abbildung 2f und 2g zeigen Formen, bei denen gefüllte oder nicht gefüllte
Spraynadeln an der Spitze mit einer leitfähigen Beschichtung versehen
sind. Dadurch ist die Spannung, die an der Elektrospray-Spitze anliegt,
unabhängig von der Leitfähigkeit der mobilen Phase. Die Redoxprozesse
finden außerhalb der Kapillare statt. Während die Variante nach Abbildung
2g wieder das Problem des zusätzlichen Totvolumens (7) aufweist, wird
dies in Abbildung 2f vermieden. Die Ausführungsform nach Abbildung 2f
zeigt damit zwar sehr vorteilhafte Eigenschaften bezüglich des
Sprühverhaltens und der Empfindlichkeit, ist aber kompliziert in der
Herstellung und hat eine nur geringe Lebensdauer. Die Kapillare muss erst
gepackt und mit einer gesinterten Einlass-Fritte (17) versehen werden,
anschließend kann die Kapillare an der Spitze mit einem leitfähigen
Überzug versehen werden. Dies muss erfolgen, ohne das Trennmateri-
al in der Kapillare zu zerstören. Bisher wird die Beschichtung daher z.B.
aufgesprüht oder aufgedampft. Die so entstehenden Schichten sind sehr
dünn und zeigen nur eine bedingte Haltbarkeit. Verfahren zur Herstellung
haltbarer Schichten würden das Trennmateri-
al oder die Fritte angreifen. Sobald die Beschichtung fehlerhaft wird, muss die gesamte Kapillarsäule
ausgetauscht werden, da die Beschichtung direkt auf die Kapillarsäule
aufgebracht ist. Somit ist diese Variante sowohl aufwendig in der
Herstellung wie auch wenig dauerhaft.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung einer
Möglichkeit zur direkten Verbindung der Trennsäulen bzw. Trennkapillaren
zur Durchführung chromatographischer und/oder elektrophoretischer
Trennverfahren mit MS Geräten. Dabei sollten sowohl Totvolumina wie
auch die Verdünnung der Probe mit Trägerflüssigkeiten vermieden werden.
Weiterhin sollte die Verbindung einfach in der Herstellung und von langer
Lebensdauer sein.

Es wurde gefunden, dass diese Anforderungen von einer Säule oder Kapillare erfüllt werden, die an einem Ende zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt ist.

5 Besonders vorteilhaft ist die Verwendung einer Kapillare mit monolithischem Sorbens.

10 Durch die bevorzugte direkte Ummantelung der Trennkapillare entfällt die Notwendigkeit einer zusätzlichen Sprühnadel oder einer Leerkapillare. Auf diese Weise werden Totvolumina vermieden. Es wurde gefunden, dass das Belegen der Kapillaren mit Metallfolie ausreicht. Eine aufwendige Beschichtung durch Besprühen oder Sputtern ist nicht notwendig. Die Ummantelung ist sehr haltbar und kann jederzeit ohne großen Aufwand ausgetauscht werden, ohne die gesamte Trennkapillare verwerfen zu müssen.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Kapillare, die an einem Ende zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Metallfolie eine Goldfolie.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Kapillare mit Sorbens gefüllt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Sorbens ein monolithisches Sorbens.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Sorbens ein anorganisches monolithisches Sorbens.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform ist, im Fall von Kapillaren, die leer sind oder mit partikulären Sorbenzien gefüllt sind, das mit Metallfolie ummantelte Ende der Kapillare sowohl außen als auch innen verjüngt und bildet eine feine Spitze.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist, im Fall von Kapillaren, die mit monolithischen Sorbenzien gefüllt sind, das mit Metallfolie ummantelte Ende der Kapillare außen verjüngt, wobei sich der äußere Durchmesser der Kapillare zum Ende hin verkleinert und der Innendurchmesser des Kapillarrohres gleich bleibt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Kopplung von kapillaren Trennverfahren mit massenspektrometrischen Analysengeräten, zumindest aufweisend eine Kapillare zur Durchführung der Trennungen und ein massenspektrometrisches Analysengerät, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare an dem zum massenspektrometrischen Analysengerät gerichteten Ende zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt ist.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Kapillare mit einem monolithischen Sorbens gefüllt.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur direkten Kopplung von Geräten zur Durchführung kapillarer Trennungen mit massenspektrometrischen Analysengeräten, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung über eine Kapillare erfolgt, die an dem zum massenspektrometrischen Analysengerätgerichteten Ende zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt ist.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von Kapillaren, die an einem Ende zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt sind, zur Erzeugung von Elektrospray zur Einbringung von Analyten in ein ESI-MS Gerät.

30 Die Abbildungen 1 und 2 zeigen verschiedene Möglichkeiten eines Interfaces nach dem Stand der Technik.

Abbildung 3 zeigt drei verschiedene Ausführungsformen einer erfindungsgemäßen Kapillare. Die Maße und Dimensionen der Kapillarsäulen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

- 5 a) Partikulär gepackte Kapillarsäule. Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der in die integrierte ESI-Spitze (14) gepackten FS Kapillarsäule (16) angebracht ist.
- 10 b) Monolithische Kapillarsäule (19). Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der rechtwinklig abgeschnittenen (20) monolithischen FS Kapillarsäule angebracht ist.
- c) Monolithische Kapillarsäule (19). Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der dort außen angespitzten monolithischen FS Kapillarsäule (21) angebracht ist.

15 Nähere Erläuterungen zu den Abbildungen 4 bis 7 finden sich in den Beispielen 1 und 2.

In den Zeichnungen sind die Kennzahlen 1 bis 22 den folgenden Begriffen zuzuordnen:

- | | | |
|----|------|--|
| | (1) | Edelstahlkapillare (SS) |
| | (2) | Hochspannungsquelle (HV) |
| 20 | (3) | „Sheath liquid“ |
| | (4) | „Sheath gas“ |
| | (5) | Kapillarsäule |
| | (6) | Offene Quarzglas Kapillare (OT-FS) als Transferleitung |
| | (7) | Totvolumen |
| 25 | (8) | T-Stück |
| | (9) | Verbindungsstück |
| | (10) | „Make up“ Fluss |
| | (11) | OT-FS ESI Nadel |
| | (12) | OT-SS ESI Nadel |
| 30 | (13) | „Distal end coated“ OT-FS ESI Nadel |
| | (14) | Integrierte ESI Nadel |
| | (15) | „Tip end coated“ integrierte ESI Nadel |

- (16) In den Tip gepackte Kapillarsäule
(17) Gesinterte Einlass-Fritte
(18) „Tip end coated“ OT-FS ESI Nadel
(19) Monolithische Kapillarsäule
5 (20) Rechtwinklig abgeschnittenes Ende
(21) Integrierte ESI Nadel (außen angespitzt)
(22) Direkt an der ESI-Spitze angebrachte Goldfolie
(23) Pfeilspitze der Goldfolie
- 10 Unter kapillaren Trennverfahren werden erfindungsgemäß chromatographische, elektrophoretische, isotachophoretische und/oder elektrochromatographische Trennungen bzw. Trennverfahren verstanden, insbesondere flüssigchromatographische Verfahren wie HPLC, mikro- oder nano-HPLC, sowie CE (Kapillarelektrophorese), CEC
15 (Kapillarelektrochromatographie) oder pCEC (pressurized CEC). Weiterhin zählen auch chromatographische, elektrophoretische, isotachophoretische und/oder elektrochromatographische Verfahren dazu, die auf miniaturisierten Systemen, wie planaren mikrostrukturierten Systemen oder Chips, durchgeführt werden.
- 20 Als Kapillaren gelten erfindungsgemäß Säulen oder Rohre, in denen die oben genannten kapillaren Trennverfahren durchgeführt werden können. Genauso fallen erfindungsgemäß Kapillarstücke, Rohre oder Nadeln, die an andere Rohre oder Kapillaren angesetzt werden können, unter den
25 Begriff Kapillare.
- 30 Die Kapillaren sind typischerweise aus Glas, fused Silica, mit Kunststoff (z.B. Polyimid) überzogenem Glas oder fused Silica, anderen keramischen oder glasartigen Materialien, Kunststoff (z.B. Fluorpolymere, Polyolefine, Polyketone, wie insbesondere Polyetherketone (bevorzugt PEEK), Acrylate, Polyamide oder Polyimide) oder faserverstärktem Kunststoff. In bevorzugten Ausführungsformen bestehen die Kapillaren aus mit Kunststoff

überzogenem fused Silica. Als Kapillare gelten weiterhin rohr- oder kanalartige Strukturen in mikrostrukturierten Bauteilen, wie z.B. planaren Mikrochips, die zumindest an einem Ende in Form eines Rohres, einer Nadel oder einer Kapillare aus dem Bauteil herausragen.

5

Sowohl der Querschnitt des in der Kapillare befindlichen Hohlraums wie auch der äußere Querschnitt der Kapillare sind bevorzugt rund geformt. Der Querschnitt kann jedoch auch jede andere Form aufweisen, z.B. eine ovale, quadratische, rechteckige oder polygonale.

10

Der Innendurchmesser der Kapillare beträgt typischerweise zwischen 1 μm und 5 mm, bevorzugt zwischen 10 und 100 μm . Die bevorzugten Durchmesser variieren je nach Art der Kapillare und der für die Trennung gewünschten Flussrate. Bevorzugt bleibt der Innendurchmesser über die

15

gesamte Länge der Kapillare konstant. Es sind jedoch auch Ausführungsformen möglich, in denen sich der Innendurchmesser insbesondere zum Ende der Kapillare hin ändert, d.h. z.B. wie bei einem konischen Verlauf kleiner wird und die Kapillare wie zu einer Spitze ausläuft. Diese Ausführungsform wird im folgenden auch als innen verjüngt oder Innen-Konus bezeichnet. Zumeist verjüngt sich dabei der Durchmesser der Kapillare auf einer Länge von 1-2 mm um den Faktor 2-10.

20

Typischerweise ist auch der äußere Durchmesser der Kapillaren konstant. In einer bevorzugten Ausführungsform ist jedoch das mit Metallfolie ummantelte Ende der Kapillare angespitzt, d.h. der äußere Durchmesser verringert sich zum Ende der Kapillare hin, so dass eine Spitze entsteht. Diese Ausführungsform wird im weiteren auch als außen verjüngt oder Außen-Konus bezeichnet.

25

30

Je nach Art der Kapillare können verschiedene Ausgestaltungen des Kapillarendes vorteilhaft sein. Bei leeren oder mit partikulären Sorbenzien

5 gefüllten Kapillaren hat sich ein innen und außen verjüngtes Ende als vorteilhaft erwiesen. Bei Kapillaren, die mit monolithischen Sorbenzien gefüllt sind, ist dieser zusätzliche Aufwand nicht notwendig. Bei Verwendung von monolithischen Sorbenzien zeigt sich auch bei Kapillaren mit konstantem Innen- und Außendurchmesser ein sehr gutes Spray-Verhalten. In einigen Fällen kann es hier vorteilhaft sein, die Kapillare außen anzuspitzen und so einen Außenkonus zu erzeugen.

10 Von besonderer Bedeutung ist der Innen- und Außendurchmesser an dem Ende der Kapillare, an dem der Elektrospray erzeugt wird. Dieses Ende wird im weiteren auch Tip genannt.

15 Im folgenden sind für verschiedene Arten von Kapillaren und bestimmte Flussraten bevorzugte Innendurchmesser (ID) und Außendurchmesser (OD) angegeben:

Leer-Kapillaren:

Tip-ID: 5-30 μm (optimal sind 8-15 μm bei Flussraten von 100-350 nl/min)

Tip-OD: so gering wie möglich

20 mit Sorbenzien gefüllte Kapillaren:

- Gepackt mit partikulären Sorbenzien, das Ende der Kapillare innen und außen verjüngt:

Tip-ID: 10-25 μm (bei Flussraten < 500 nl/min)

Tip-OD: so gering wie möglich

- 25 - mit monolithischem Sorbens, Innendurchmesser gleichbleibend:

ID: 50-100 μm (bei Flussraten > 500 nl/min)

OD: so gering wie möglich oder bevorzugt Kapillaren außen anspitzen.

ID: 10-50 μm (bei Flussraten < 500 nl/min)

30 OD: so gering wie möglich oder bevorzugt Kapillaren außen anspitzen.

Prinzipiell sind bei Einsatz von Kapillaren mit monolithischen Sorbenzien IDs $< 50 \mu\text{m}$ von Vorteil, da die optimalen Flussraten für diese monolithischen Kapillaren auch denen für Mikro- und Nanoelektrospray entsprechen. Vorteilhaft für die Ionisierungs-Effizienz ist auch, die monolithischen Sorbenzien direkt in Kapillaren mit Innen und/oder Außen-Konus zu synthetisieren. Ein Aussenkonus kann problemlos auch nachträglich an der mit monolithischem Sorbens gefüllten Kapillare erzeugt werden.

Die Länge der erfindungsgemäßen Kapillaren variiert je nach Art der Kapillare. Es kann sich bei der Kapillare um eine kurze Nadel oder Spitze z.B. zum Aufsatz auf andere Kapillaren oder Säulen handeln. Dann liegt die Länge typischerweise bei 1 cm bis 20 cm. Genauso kann es sich bei der Kapillare um eine Trennkapillare handeln. Dann liegt die Länge typischerweise zwischen 2 und 200 cm.

Ansonsten entsprechend die Dimensionen der erfindungsgemäßen Kapillaren den im Stand der Technik üblichen Dimensionen.

Die erfindungsgemäßen Kapillaren können leer, auf der Innenseite ganz oder teilweise beschichtet oder ganz oder teilweise mit Sorbens gefüllt sein. Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Kapillaren mit Sorbens gefüllt. Wenn die Kapillare mit partikulären Sorbenzien gefüllt ist, weist sie zudem in der Regel am Ende eine Fritte, ein Sieb oder einen Filter auf, um das Sorbens in der Kapillare zu fixieren.

Ein Sorbens ist ein Material auf dem kapillare Trennungen durchgeführt werden können. Typischerweise handelt es sich dabei um eine Festphase aus anorganischen und/oder organischen, partikulären oder monolithischen Materialien. Als organische Materialien kommen z.B. Partikel oder monolithische Materialien in Betracht, die z.B. durch radikalische, ionische oder thermische Polymerisation erzeugt werden. Es

5 kann sich beispielsweise um Poly(meth)acrylsäurederivate, Polystyrolerivate, Polyester, Polyamide oder Polyethylene handeln. Die entsprechend einzusetzenden Monomeren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der organischen Polymere bekannt. Beispielsweise sind dies monoethylenisch oder polyethylenisch ungesättigte Monomere, wie Vinyl-Monomere, vinylaromatische und vinylaliphatische Monomeren, z.B. Styrol und substituierte Styrole, Vinylacetate oder Vinylpropionate, acrylische Monomere, wie Methacrylate und andere Alkylacrylate, Ethoxymethylacrylat und höhere Analoga und die entsprechenden 10 Methacrylsäureester oder deren Amide, wie Acrylamid oder Acrylnitril. Weitere monoethylenisch und polyethylenisch ungesättigten Monomere finden sich beispielsweise in EP 0 366 252 oder US 5,858,296.

15 Als anorganische Materialien kommen z.B. partikuläre oder monolithische Materialien aus Glas, Keramik, anorganischen Oxiden, wie Aluminiumoxid, Zirkoniumdioxid oder Titandioxid oder bevorzugt aus Silika-Materialien (Kieselgel) in Betracht.

20 Weiterhin kann das Sorbens aus organisch/anorganischen Hybridmaterialien bestehen. Dies sind beispielsweise anorganische Materialien, die mit einer organischen Beschichtung versehen sind. Weiterhin kann es sich um anorganisch/organische Mischpolymerisate handeln. Beispielsweise können im Falle der Materialien auf Silika-Basis statt der rein anorganische Materialien erzeugenden Tetraalkoxysilane 25 Organoalkoxysilane mit ein bis drei organischen Resten eingesetzt werden.

Partikuläre Sorbenzien können aus gleichmäßig oder ungleichmäßig geformten porösen oder unporösen Partikeln bestehen. Monolithische Sorbenzien bestehen aus porösen Formkörpern. Die 30 Porenverteilung kann mono-, bi-, tri- oder polymodal sein. Typischerweise handelt es sich um Materialien mit einer mono- oder bimodalen Porenverteilung.

Alle Sorbenzien können zudem mit Separationseffektoren modifiziert sein, um bestimmte Trenneigenschaften hervorzurufen.

5 Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß Kapillaren mit monolithischen Sorbenzien, besonders bevorzugt mit anorganischen monolithischen Sorbenzien eingesetzt. Es wurde gefunden, dass aus Kapillaren mit monolithischen Sorbenzien ein besonders gleichmäßiger und feiner Elektrospray erzeugt werden kann.

10 Bevorzugt werden daher monolithische Materialien mit Makroporen mit einem mittleren Durchmesser von über 0,1 μm , bevorzugt zwischen 1 μm und 10 μm , eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Materialien zusätzlich Mesoporen mit einem Durchmesser zwischen 2 und 100 nm. WO 99/38006 und WO 99/50654 offenbaren Verfahren zur Herstellung von Kapillaren, die mit monolithischem Silika-Material gefüllt sind. Auch in WO 95/03256 und besonders in WO 98/29350 werden Verfahren zur Herstellung anorganischer monolithischer Formkörper nach einem Sol-Gel Prozeß offenbart.

20 Ein Grund für den besonders stabilen und feinen Elektrospray bei Einsatz der monolithischen Materialien könnte deren besondere Porenstruktur sein, da der Effekt besonders bei monolithischen Materialien mit makroporösen Durchflusssporen beobachtet wird.

25 Ein erfindungsgemäß geeignetes MS-Gerät ist ein Massenspektrometer, in das die Probe in Form eines Elektrosprays aufgegeben wird. Typischerweise handelt es sich also um ein Massenspektrometer mit ESI- und/oder nano ESI-Quelle.

30

Als Metallfolie wird erfindungsgemäß eine Folie aus leitendem Metall oder Metallegierungen bezeichnet. Die Dicke der Folie beträgt aus Gründen der Verarbeitbarkeit in der Regel über 10 µm, typischerweise zwischen 20 und 100 µm. Bei Gold liegt die bevorzugte Dicke z.B. zwischen 10 und 50 µm. Geeignete Metalle sind solche, die sich als Folie in der geeigneten Dicke herstellen und verarbeiten lassen und elektrisch leitend sind. Beispiele hierfür sind:

- Gold
- Aluminium
- Platin
- Titan
- Palladium
- Silber

Weiterhin sind Legierungen aus und/oder mit einem oder mehreren dieser Metalle geeignet sowie andere Legierungen wie z.B. Edelstähle. Erfindungsgemäß wird bevorzugt Goldfolie eingesetzt. Als gut geeignet hat sich *Alfa Aesar Gold Foil*; 25 x 25 mm, 0.025 mm dick, Premion®, 99.985% (metals basis) erwiesen.

Länge und Breite der für die Ummantelung eingesetzten Metallfolie sind von der jeweiligen Kapillare und auch dem eingesetzten MS-Gerät abhängig. In der Regel weist die Kapillare an einem Ende eine Ummantelung mit Metallfolie auf, die die Kapillaraußenseite vom Ende der Kapillare ausgehend auf einer Länge von mindestens 3 mm, typischerweise zwischen 5 mm und 10 cm bedeckt. Dabei kann die Kapillare vollständig von der Folie umschlossen werden oder aber nur zu einem Teil. Typischerweise ist mindestens 1/6 des Umfangs der Kapillare bedeckt. Bevorzugt ist 1/4 bis die Hälfte des Umfangs der Kapillare bedeckt. Die in Abbildung 3 gezeigten Ausführungsformen weisen z.B. eine Ummantelung auf, bei der die Hälfte des Umfangs mit Folie bedeckt ist. Wichtig ist, dass der Kontakt der Flüssigphase in der Kapillare zu der Metallfolie gegeben ist.

Typischerweise sollte daher der Abstand der Metallfolie vom Ende der Kapillare, d.h. dem Flüssigkeitsauslass bzw. dem Hohlraum der Kapillare, nicht mehr als ca. 50 µm betragen. Andererseits darf gerade bei kleinen Durchmessern am Ende der Kapillare die Folie die Geometrie am Ausgang der Kapillare nicht merklich verändern. Sonst kann kein stabiler und gleichmäßiger Spray erzeugt werden. Um diese Anforderungen zu gewährleisten, kann die Form der Metallfolie optimal gewählt werden. Die Form der Metallfolie kann quadratisch, rechteckig, dreieckig, rund, oval, polygonal etc. sein. Um einen optimalen Elektrospray zu erzeugen haben sich Formen als vorteilhaft erwiesen, bei denen die Folie zum Kapillar-Tip hin spitz zuläuft, so dass die Spitze der Folie die Spitze der Kapillare erreicht.

Eine mögliche Ausführungsform zeigt Abbildung 3. Hier wird bei einer am Ende zugespitzten Kapillare (14, 21) die Folie zum Ende hin auch zugespitzt und wie ein Schiffchen um die Kapillare gelegt, so dass die Spitze der Metallfolie (23) direkt am Rand des Kapillarendes zu liegen kommt. Bei Kapillaren, deren Durchmesser sich zum Ende hin nicht verändert (20), wird die Folie bevorzugt leicht um das Ende der Kapillare herumgeknickt, so dass sie die Dicke der Wand der Kapillare bedeckt und bis an den inneren Hohlraum heranreicht.

Die Fixierung der Metallfolie erfolgt z.B. durch Erwärmen, Kleben oder mithilfe einer Fixierung, z.B. in Form eines Kunststoffmantels oder -ringes. Abbildung 3 zeigt drei mögliche Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Kapillare. In diesem Fall wurde zur Kontaktlegung jeweils Goldfolie verwendet. SV bezeichnet die Seitenansicht der Kapillaren, FV die Ansicht der Kapillarspitze von vorne.

In Abbildung 3a) wird eine Ausführungsform gezeigt, bei der eine innen und außen zugespitzte Kapillare (geformt entsprechend einer nano ESI Nadel) mit partikulärem Sorbens gefüllt ist (16). Die Goldfolie (22) umschließt die Hälfte des Endes der Kapillare und läuft zur Spitze der Kapillare hin spitz zu (23), so dass sie direkt am Ende der Kapillare anliegt aber nicht merklich in

den Hohlraum bzw. Kanal der Kapillare hereinragt. So wird die Geometrie der Austrittsöffnung nicht beeinträchtigt.

Genauere Angaben zur Dimension der Kapillare und der Goldfolie finden sich in Tabelle 1.

- 5 In Abbildung 3b) wird eine Kapillare mit monolithischem Sorbens (19) gezeigt, deren Ende glatt abgeschnitten ist und nicht spitz zuläuft (20). Die Goldfolie (22) umschließt die Hälfte des Endes der Kapillare und ist leicht um den Rand der Kapillare herumgeknickt (23), so dass sie direkt an der Öffnung der Kapillare anliegt aber nicht stark in den Hohlraum bzw. Kanal
- 10 der Kapillare hereinragt. So wird die Geometrie der Austrittsöffnung nicht beeinträchtigt. Genauere Angaben zur Dimension der Kapillare und der Goldfolie finden sich in Tabelle 1.

- 15 Abbildung 3c) zeigt eine Kapillare mit monolithischem Sorbens (19), deren Ende außen spitz zuläuft (21). Die Goldfolie (22) umschließt die Hälfte des Endes der Kapillare und läuft zur Spitze der Kapillare hin spitz zu (23), so dass sie direkt am Ende der Kapillare anliegt aber nicht merklich in den Hohlraum bzw. Kanal der Kapillare hereinragt. So wird die Geometrie der Austrittsöffnung nicht beeinträchtigt.

- 20 Genauere Angaben zur Dimension der Kapillare und der Goldfolie finden sich in Tabelle 1.

	Ausführungsform	3a)	3b)	3c)
	äußerer Durchmesser der Kapillare [μm]	365	165	365
	innerer Durchmesser der Kapillare [μm]	20-250	20-100	20-250
25	innerer Durchmesser (ID) der Spitze [μm]	5-30	20-100	20-250
	äußerer Durchmesser der Spitze [μm]	ID + 10	165	= ID
	Länge der Goldfolie [cm]	2	2	2
	Breite der Goldfolie [μm]	570	260	570
30	Dicke der Goldfolie [μm]	25	25	25
	Form der Goldfolie	Pfeilspitze		

Tabelle 1

Die erfindungsgemäß mit Metallfolie ummantelte Kapillare wird, sofern eine vorherige Auftrennung der Analyten gewünscht wird, auf bekannte Weise zur Auftrennung von Analyten eingesetzt. Sie kann genauso für eine Offline Nano ESI Messung eingesetzt werden, d.h. eine Messung ohne vorherige Trennung. Zur Kopplung mit dem MS-Gerät wird wie bei anderen Spraynadeln auch an die Metallfolie Spannung angelegt, so dass ein Elektrospray entsteht. Mit den erfindungsgemäßen Kapillaren kann ein stabiler Spray bei Flussraten zwischen 50 nl/min und 5 µl/min erzeugt werden. Dabei liegen für Tip-Innendurchmesser von ca. 10 µm die geeigneten Flussraten zwischen 50-1000 nl/min, bevorzugt zwischen 200-300 nl/min. Für Tip-Innendurchmesser von ca. 100 µm liegen die geeigneten Flussraten zwischen 0,5-5 µl/min, bevorzugt zwischen 1-2 µl/min. Bei Ausführungsformen mit monolithischen Sorbenzien können bei Innendurchmessern von ca. 100 µm sogar höhere Flussraten, d.h. > 5 µl/min, z.B. 10-20 µl/min, erzeugt werden. Zudem zeigen Kapillaren mit monolithischen Sorbenzien eine höhere Flussratenvarianz. Bei Flussraten von <500nl/min sollte der Abstand der Kapillare zum Eingang des MS-Gerätes ca. 3-10 mm betragen. Bei Flussraten >500nl/min sollte der Abstand bei ca. 7-25 mm liegen.

Welcher MS-Modus und welche Spannung optimal sind, ist abhängig vom Tip-ID, Tip OD, der Flussrate, dem Abstand Tip ↔ Orifice (Eingang MS-Gerät) und auch von der Art des zu versprühenden Laufmittels (z.B. Dielektrizitätskonstante, Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, Viskosität, Dampfdruck). Alle diese Parameter müssen aufeinander abgestimmt werden.

Für den Nano ESI-Mode sind in der Regel Spannungen zwischen 1600 und 2300 V geeignet. Für den Normal ESI-Mode sind in der Regel Spannungen zwischen 2800-5500 V geeignet.

Geeignete Laufmittel sind aus dem Stand der Technik für diese Art von Anwendung bekannt. Bevorzugt sollte das Laufmittel zu über 98% aus

5 einem Gemisch aus entionisiertem Wasser und Methanol, Ethanol, Propanol und/oder Acetonitril bestehen. Elektrolytische Zusätze (Säuren, Basen, Puffer) sollten auch von flüchtiger Natur sein (z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Ammoniak, sek. & tert. Amine, Ammoniumformiat, Ammoniumacetat, Ammoniumhydrogencarbonat).

10 Die erfindungsgemäßen Kapillaren zeichnen sich durch eine sehr lange Haltbarkeit aus. Sollte die Metallfolie dennoch beschädigt sein, kann sie einfach entfernt und durch eine neue Folie ersetzt werden. Dabei ist es nicht notwendig, die Trennkapillare mit auszutauschen. Bei Kapillaren mit monolithischen Sorbenzien kann falls nötig einfach das beschädigte Ende der Kapillare abgeschnitten (und gegebenenfalls neu angespitzt) werden und das neu erzeugte Ende wieder mit derselben Metallfolie ummantelt werden.

15 Somit ist die erfindungsgemäße Kapillare einfach herzustellen und zu verwenden. Beschädigte Teile können ausgetauscht werden, ohne die gesamte Kapillare erneuern zu müssen. Wie aus Beispiel 1 ersichtlich ist, haben die erfindungsgemäßen Kapillaren eine sehr lange Lebensdauer. Es
20 kann ein stabiler Spray erzeugt werden. Auch zufällige Spannungsüberschläge (electrical arcing) und mehrere Pausen haben kaum Einfluss auf die Stabilität.

25 Weitere Vorteile, insbesondere der bevorzugten Ausführungsformen, gegenüber dem Stand der Technik sind:

- Da der Spray bevorzugt direkt aus der Trennkapillare erzeugt wird, entstehen keine zusätzlichen Totvolumina durch aufgesetzte Spraynadeln.
- Es finden keine Elektroden-Redoxprozesse in der Kapillare statt.
- 30 - Am Ende der Kapillare (ESI-Tip) ist die Feldstärke konstant.
- Es findet keine Verdünnung mit Trägerflüssigkeit statt.

- 5 - Es können sehr niedrige Flussraten verwendet werden, so das kleinere Tropfen entstehen und zudem das Kapillarende näher an den Eingang des MS-Gerätes herangeführt werden kann. Somit können die Ionisierungseffizienz und die Ionen-Sampling-Rate deutlich erhöht werden.

10 Somit stellt die erfindungsgemäße Kapillare eine wertvolle Verbesserung zur Kopplung von chromatographischen, elektrophoretischen, elektrochromatographischen und/oder isotachophoretischen Trennverfahren mit MS dar.

15 Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

20 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

Beispiele

1. Stabilität des Elektrosprays

25 Zum Vergleich der Stabilität und Lebensdauer der erfindungsgemäßen Vorrichtung und Kapillare mit bekannten und kommerziell erhältlichen Systemen wurden erfindungsgemäße Kapillaren mit Fused Silica Nadeln der Firma New Objective verglichen. Soweit feststellbar sind die Nadeln der Firma New Objective mit Gold oder einer Goldlegierung bedampft.

30 Nähere Daten zu den eingesetzten Kapillaren und der Versuchsdurchführung finden sich in Tabelle 2.

Abbildung	4a	4b	4c
ESI-Nadel	Aus Quarzglas, Tip Ende mit Gold- Folie ummantelt	Aus Quarzglas, distales Ende bedampft	Aus Quarzglas, Tip Ende bedampft
Best.-Nr. bei New Objective	FS 360-20-10 N (nicht bedampft)	FS 360-20-10 D	FS 360-20-10 CE
OD der Kapillare [μm]	360	360	360
ID der Kapillare [μm]	20	20	20
ID der Spitze [μm]	10	10	10
El. Kontakt durch	Goldfolie	Metallbedampfung	Metallbedampfung
Kapillare	offen (open tubular OT)		
Mobile Phase	49,95 % Methanol / 49,95 % Wasser / 0,1 % Ameisensäure		
Flussrate	300 nl/min		
Spannung	1800 V		
MS-Gerät	QSTAR XL™ von Applied Biosystems MDS SCIEX		

Tabelle 2

Abbildung 4a zeigt die eingesetzte erfindungsgemäße Kapillare. Sie besteht aus fused Silica (11), besitzt die gleiche Geometrie wie die Kapillaren des Standes der Technik und ist am Ende mit einer pfeilförmigen Goldfolie (Alfa Aesar Gold Foil; 25 x 0,57 mm, 0,025 mm dick, Premion®, 99,985% (metals basis)) ummantelt, d.h. der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie, welche direkt am Spray-Ende der dort innen und außen verjüngten ESI-Spitze der OT-FS-Nadel angebracht ist (22).

Abbildung 4b zeigt eine Kapillare nach dem Stand der Technik, deren hinteres Ende mit Gold besputtert ist (13), d.h. der elektrische Kontakt erfolgt über eine leitenden Beschichtung (Metallbedampfung) am stumpfen hinteren Ende OT-FS-ESI-Nadel.

5

Abbildung 4c zeigt eine Kapillare nach dem Stand der Technik, deren Spitze mit Gold besputtert ist (18), d.h. der elektrische Kontakt erfolgt über eine elektrisch leitende Beschichtung (Metallbedampfung) am Spray-Ende der dort innen und außen verjüngten ESI-Spitze der OT-FS-Nadel.

10

Abbildung 5 zeigt im Vergleich die Sprayeigenschaften der drei Kapillaren (a, b und c entsprechend Abbildung 4). Die y-Achse zeigt den Gesamtionenstrom (Total Ion Current) in cps (counts per second), die x-Achse die Zeit in Stunden (h). Es zeigt sich, dass die Kapillaren a) und b) über 48 Stunden einen stabilen Spray erzeugen, wohingegen die Kapillare c) bereits nach 8 Stunden Unregelmäßigkeiten zeigt. Die erfindungsgemäße Kapillare a) wurde nach diesem Versuch noch weitere 2000 Stunden verwendet und zeigte noch immer keinen Qualitätsverlust.

15

20

2. Vergleich monolithische/partikuläre Sorbenzien

Abbildung 6 zeigt den Aufbau der drei erfindungsgemäßen Kapillaren, deren Sprayeigenschaften verglichen wurden.

25

a) Monolithische Kapillarsäule (19). Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der dort außen angespitzten (21) monolithischen FS Kapillarsäule angebracht ist.

b) Monolithische Kapillarsäule (19). Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der rechtwinklig abgeschnittenen (20) monolithischen FS Kapillarsäule angebracht ist.

30

c) Partikulär gepackte Kapillarsäule (19). Der elektrische Kontakt erfolgt über eine Goldfolie (22), welche direkt am Spray-Ende der in die integrierte ESI-Spitze (14) gepackten FS Kapillarsäule angebracht ist.

Nähere Daten zu den eingesetzten Kapillaren und der Versuchsdurchführung finden sich in Tabelle 3.

Abbildung	6a	6b	6c
Kapillarsäule	Monolithische Kapillarsäule mit Gold-Folie ummantelt	Monolithische Kapillarsäule mit Gold-Folie ummantelt	Gepackte Kapillarsäule mit Gold-Folie ummantelt
Tip-Form	Außen angespitzt	Gerade abgeschnitten	Außen und innen verjüngt
OD/ID der Kapillare [μm]	365/100	164/100	365/100
OD/ID des Tips [μm]	100/100	164/100	50/30
Stationäre Phase	Chromolith™ CapRod RP-18e	Chromolith™ CapRod RP-18e	Purospher™ STAR RP-18 3 μm
El. Kontakt durch	pfeilförmige Goldfolie		
Kapillare	mit Sorbens gefüllt, 25 cm lang		
Mobile Phase	49,95 % Acetonitril / 49,95 % Wasser / 0,1 % Ameisensäure		
Flussrate	500 nl/min	1000 nl/min	300 nl/min
Abstand Tip↔Orifice	7 mm	15 mm	5 mm
ESI-Modus	nano	normal	nano
Spannung	2350 V	3700 V	1750 V
MS-Gerät	QSTAR XL™ von Applied Biosystems MDS SCIEX		

Tabelle 3

Abbildung 7 zeigt im Vergleich die Sprayeigenschaften der drei Kapillaren (a, b und c entsprechend Abbildung 6). Die Versuchsbedingungen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die y-Achse zeigt den Gesamtionenstrom (Total Ion Current) in cps (counts per second), die x-Achse die Zeit in Stunden (h). Es zeigt sich, dass eine monolithische Kapillare (Abbildung 6b) und c)) auch ohne sich innen verjüngenden Durchmesser ähnlich gute Sprayeigenschaften hat wie die mit partikulärem Sorbens gefüllte Spraynadel (Abbildung 6a)). Alle drei Ausführungsformen (Abbildung 6a)-c)) zeigen bessere Sprayeigenschaften als der Stand der Technik (s. Abbildung 5b) und c)). Die Unterschiede zwischen den drei Kapillarsäulen liegen im mit ihnen möglichen Flussratenbereich (Abhängig vom Tip OD/ID) in dem ein stabiler Elektrospray möglich ist. Dies wirkt sich auch auf die Ionisierungseffizienz und die Ionen-Sampling-Rate aus, die beide bei kleineren Flussraten höher liegen. Zudem wird mit zunehmender Flussrate (ohne geeigneten zusätzlichen Sheath flow) die mögliche Zusammensetzung der mobilen Phase zunehmend eingeschränkt.

Ansprüche

- 5 1. Kapillare, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare zumindest an einem Ende mit Metallfolie ummantelt ist.
2. Kapillare nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallfolie eine Goldfolie ist.
- 10 3. Kapillare nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare mit Sorbens gefüllt ist.
4. Kapillare nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Sorbens ein monolithisches Sorbens ist.
- 15 5. Kapillare nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Sorbens ein anorganisches monolithisches Sorbens ist.
- 20 6. Kapillare nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass das mit Metallfolie ummantelte Ende der Kapillare außen angespitzt ist.
7. Kapillare nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare leer ist oder mit partikulärem Sorbens gefüllt ist und das mit Metallfolie ummantelte Ende innen und außen verjüngt ist.
- 25 8. Vorrichtung zur Kopplung von kapillaren Trennverfahren mit massenspektrometrischen Analysengeräten zumindest aufweisend eine Kapillare zur Durchführung der Trennungen und ein massenspektrometrisches Analysengerät, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare zumindest an dem zum massenspektrometrischen
- 30 Analysengerät gerichteten Ende mit Metallfolie ummantelt ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare mit einem monolithischen Sorbens gefüllt ist.

5 10. Verfahren zur direkten Kopplung von Geräten zur Durchführung kapillarer Trennungen mit massenspektrometrischen Analysengeräten, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung über eine Kapillare erfolgt, die zumindest an dem zum massenspektrometrischen Analysengerät gerichteten Ende mit Metallfolie ummantelt ist.

10 11. Verwendung von Kapillaren, die zumindest an einem Ende mit Metallfolie ummantelt sind, zur Erzeugung von Elektrospray zur Einbringung von Analyten in ein ESI-MS Gerät.

15

20

25

30

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Kapillaren, die zumindest teilweise mit Metallfolie ummantelt sind sowie deren Einsatz bei der Kopplung von Verfahren wie HPLC, CE (Kapillarelektrophorese), CEC (Kapillarelektrochromatographie) oder pCEC (pressurized CEC) mit MS (Massenspektrometrie). Durch die erfindungsgemäße Ummantelung mit Metallfolie ist eine direkte Kopplung der Kapillaren an ein Massenspektrometer ohne Verwendung weiterer Übergangsstücke, wie Spraynadeln oder Leerkapillarstücken, möglich.

5

10

15

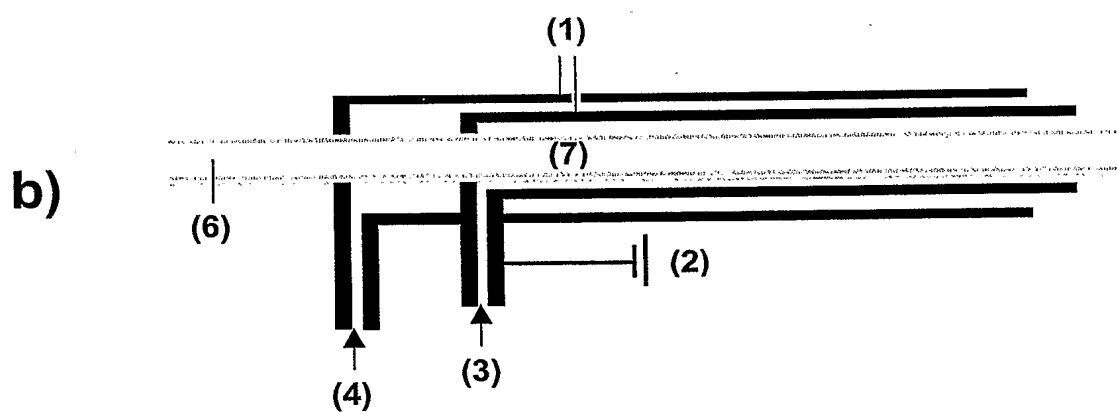
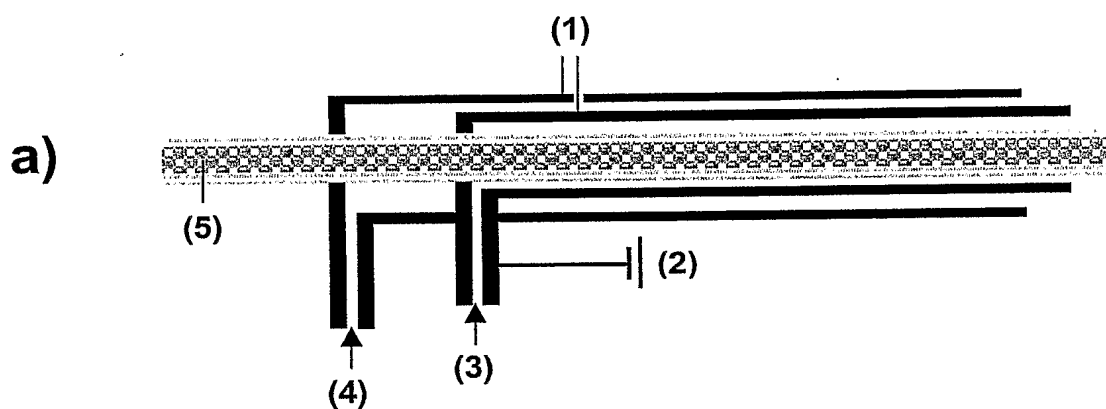
20

25

30

1/7

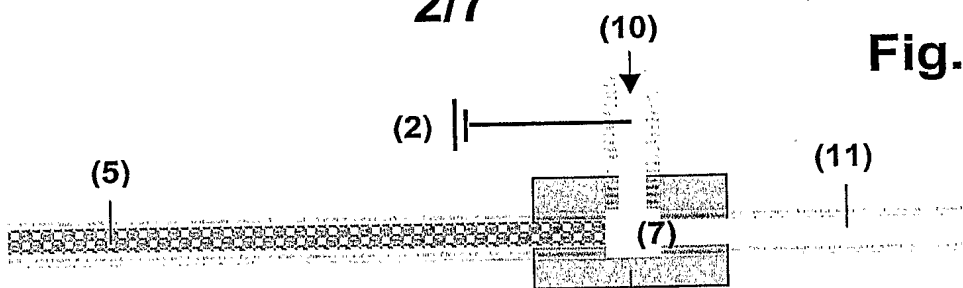
Fig. 1



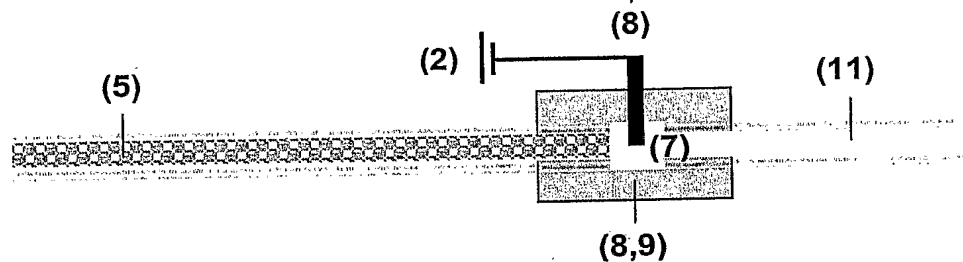
2/7

Fig. 2

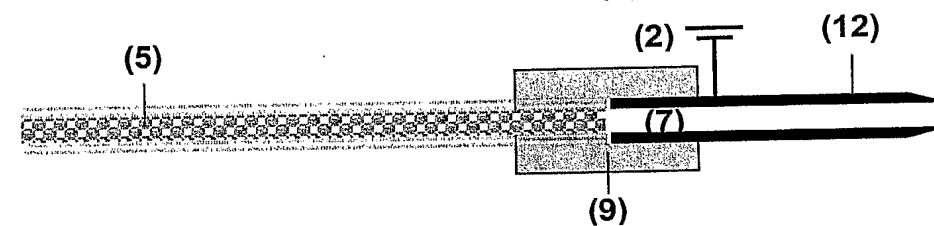
a)



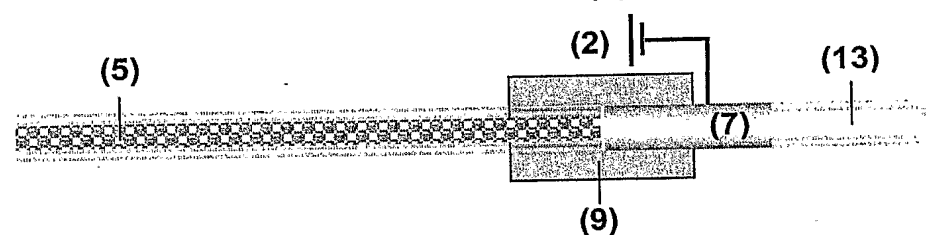
b)



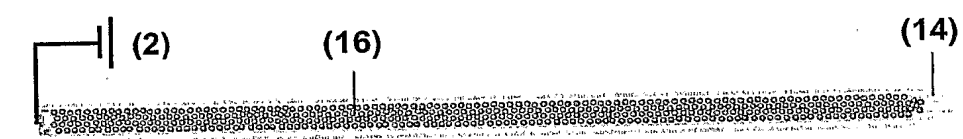
c)



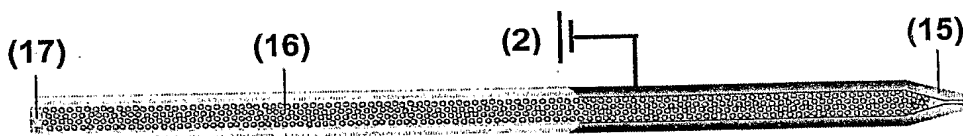
d)



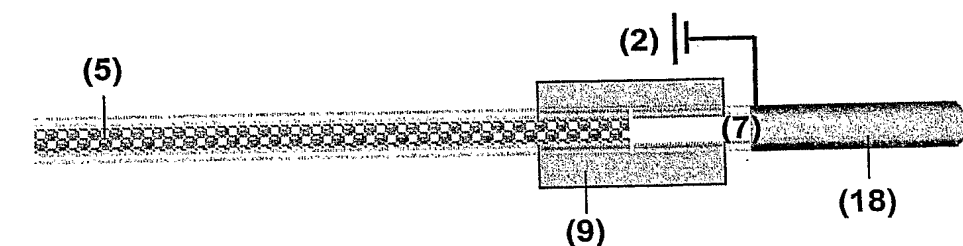
e)



f)



g)



3/7

Fig. 3

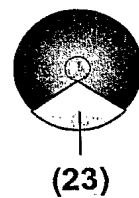
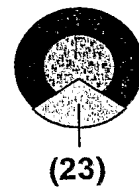
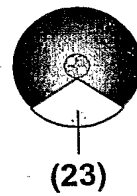
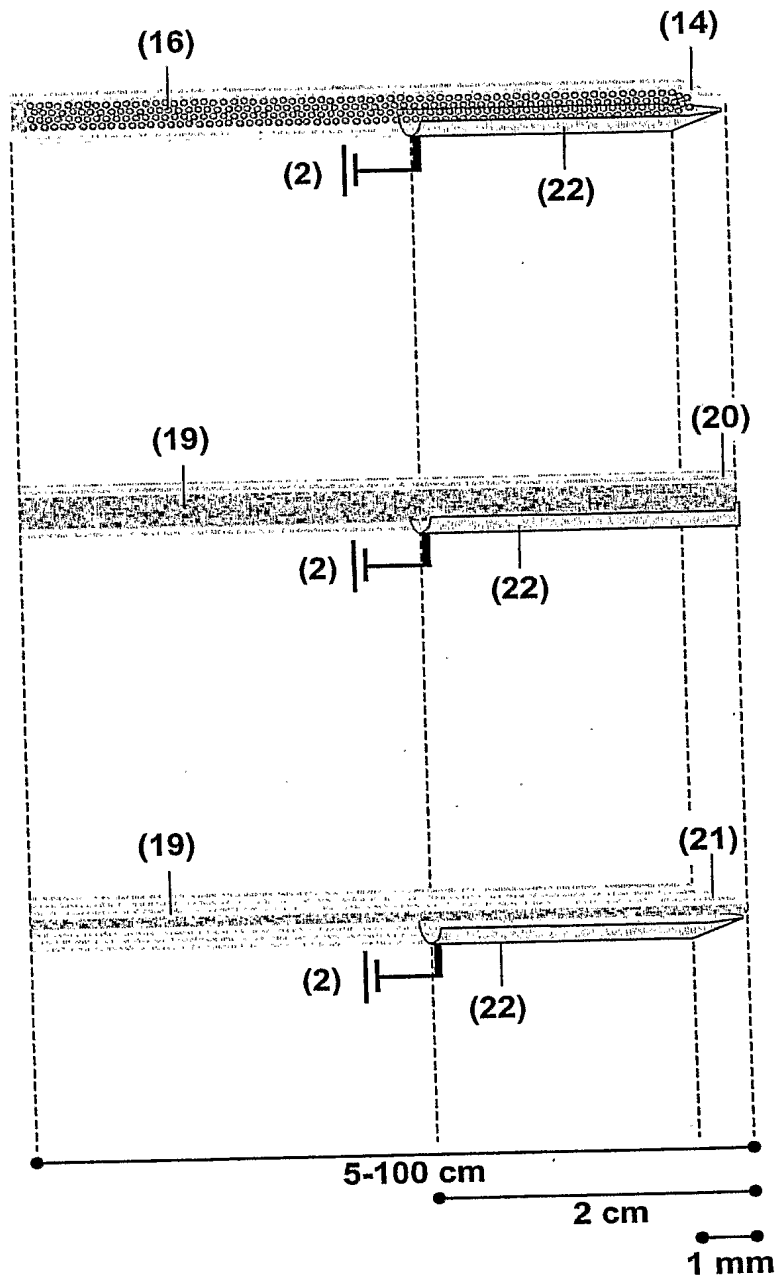
S V

F V

a)

b)

c)



4/7

Fig. 4

a)

(11)

(22)

b)

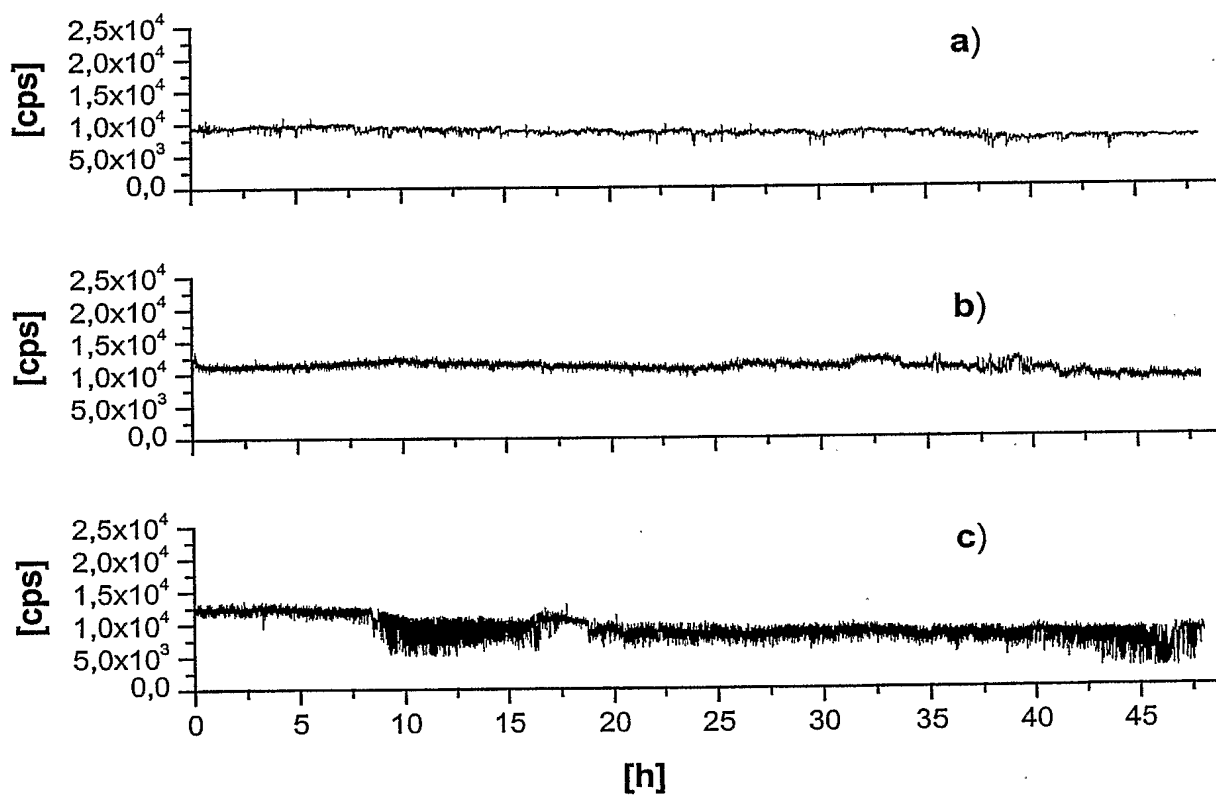
(13)

c)

(18)

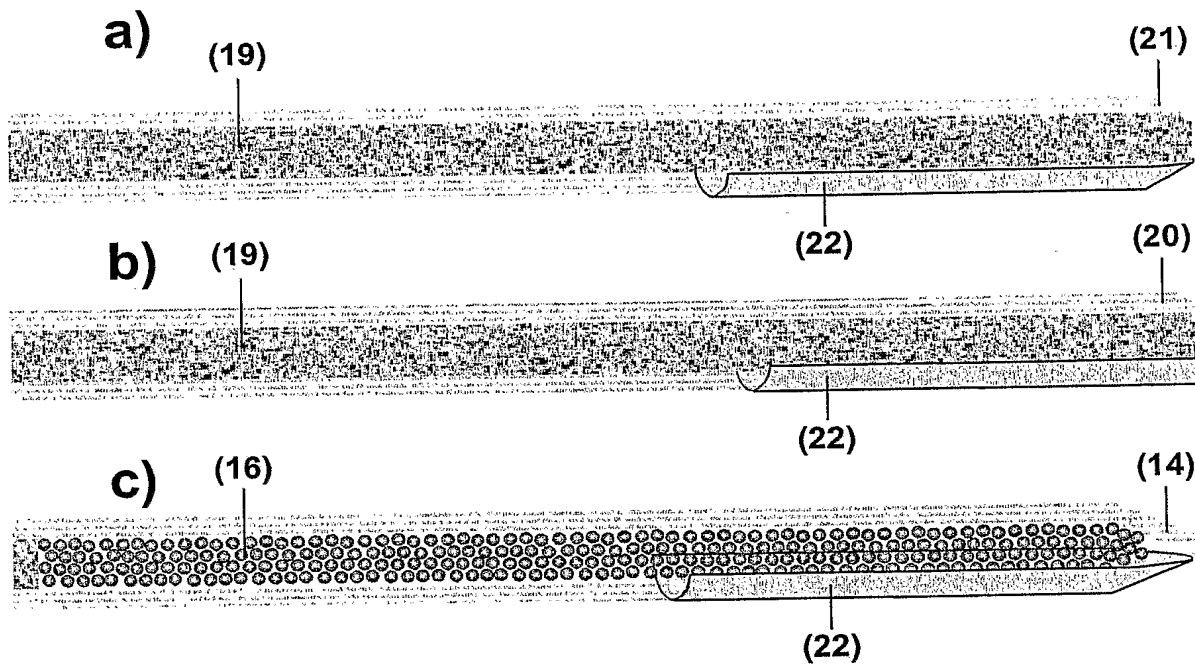
5/7

Fig. 5



6/7

Fig. 6



7/7

Fig. 7

